1, 2, 3-トリメチルベンゼンの細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：2465（115－032）

財団法人
食品農医薬品安全性評価センター

目　　次

1.	要　　約	1 頁
2.	試 験 題 目	2
3.	試 験 目 的	2
4.	試 験 番 号	2
9.	被 験 物 質	3
10.	試験材料及び方法	4
11.	試 験 結 果	9
12.	考察及び結論	10
13.	参考とした資料	11
14.	資 料 の 保 管	12

Figures 及び Tables

Figure 1	Bacterial reversion test of 1,2,3-Trimethylbenzene in strain TA100	13
Figure 2	Bacterial reversion test of 1,2,3-Trimethylbenzene in strain TA1535	14
Figure 3	Bacterial reversion test of 1,2,3-Trimethylbenzene in strain WP2 *uvrA*	15
Figure 4	Bacterial reversion test of 1,2,3-Trimethylbenzene in strain TA98	16
Figure 5	Bacterial reversion test of 1,2,3-Trimethylbenzene in strain TA1537	17
Table 1	Results of the bacterial reversion test of 1,2,3-Trimethylbenzene (1st trial) [direct method : -S9]	18
Table 2	Results of the bacterial reversion test of 1,2,3-Trimethylbenzene (1st trial) [activation method : +S9]	19
Table 3	Results of the bacterial reversion test of 1,2,3-Trimethylbenzene (2nd trial) [direct method : -S9]	20
Table 4	Results of the bacterial reversion test of 1,2,3-Trimethylbenzene (2nd trial) [activation method : +S9]	21

1．要　　約：

本試験条件下において、1,2,3-トリメチルベンゼンには遺伝子突然変異を誘発する作用がないものと判断した。

すなわち、1,2,3-トリメチルベンゼンの変異原性について、遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）TA100 、TA98、TA1535及びTA1537株ならびに大腸菌（*Escherichia coli*）WP2 *uvrA* 株を用いた復帰突然変異試験を行った。
あらかじめ予備的な試験を実施し、本試験の用量を設定した。その結果、1,2,3-トリメチルベンゼン処理の場合、1.42～182 μg／プレートのいずれの試験用量においても、ラット肝ミクロソーム（Ｓ９）添加の有無にかかわらず、溶媒対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。
一方、直接法及び代謝活性化法での陽性対照物質は、すべての試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

2．試　験　題　目：　1,2,3-トリメチルベンゼンの細菌を用いる復帰突然変異試験

3．試　験　目　的：　遺伝子突然変異誘発性を検討するため、環保業第 237号、薬発第 306号、62基局第 303号（昭和62年 3 月31日）の「新規化学物質に係る試験の方法について」及びＯＥＣＤ化学品テストガイドライン 471、472 （1983年）に従って、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。なお、試験の実施は環企研第 233号、衛生第38号、63基局第 823号（昭和63年11月18日）の「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第４条に規定する試験施設について」及びＯＥＣＤのＧＬＰ（1982年）の基準を満たすものとした。

4．試　験　番　号：　２４６５（ 115－032 ）

9．被　験　物　質：

1）被験物質名　　1,2,3-トリメチルベンゼン

2）ロット番号

3）純　　度　　90.8%

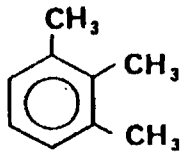
4）提　供　先

5）保管条件　　遮光・室温

6）一　般　名　　Hemimellitene; Hemimellitol

7）化　学　名　　1,2,3-Trimethylbenzene

8）化学構造



9）分　子　式　　C_9H_{12}

10）分　子　量　　120.20

11）CAS No.　　526－73－8

12）比　　重　　0.8986

13）物質の状態　　液体

14）融　　点　　－25℃

15）沸　　点　　175～176 ℃

16）被験物質保管及び残余被験物質の処理　　試験終了後、残りの被験物質は染色体異常試験に使用した。

１０．試験材料及び方法：

1) 試験菌株

次の５種類の菌株を用いた。

a.	ネズミチフス菌	TA100	（ヒスチジン要求性の塩基対置換型）
b.	ネズミチフス菌	TA98	（ヒスチジン要求性のフレームシフト型）
c.	ネズミチフス菌	TA1535	（ヒスチジン要求性の塩基対置換型）
d.	ネズミチフス菌	TA1537	（ヒスチジン要求性のフレームシフト型）
e.	大　腸　菌	WP2 *uvrA*	（トリプトファン要求性の塩基対置換型）

ネズミチフス菌は昭和５８年９月９日に　　から、また、大腸菌は昭和５８年３月１６日に　　から分与を受けた。平成６年９月５日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

各菌株の菌懸濁液 80 容量に対し、ジメチルスルホキシド（DMSO：GC用；MERCK 社、独国；純度99.7%以上、Lot No. 309 K18572778 ）７容量の割合で加えて混合した後、小試料チューブ（NUNC社、デンマーク）に 0.2 ml ずつ分注した。液体窒素（LN_2）を用いて凍結した後、超低温フリーザー（ MDF-390AT；三洋電機特機株式会社、大阪府守口市）に－80℃で保存した。

2) 培地の調製

a. 最少グルコース寒天平板培地（プレート）

試験には日清製粉株式会社（東京都中央区）から購入したプレート（テスメディア AN 培地）を用いた。本プレートは、下記の組成の溶液（Vogel-Bonner最少培地Ｅ等）をそれぞれオートクレーブ滅菌した後、γ線滅菌シャーレに 30 mlずつ無菌的に分注したものである。

硫酸マグネシウム・７水塩	0.2	g
クエン酸１水塩	2	g
リン酸２カリウム・無水塩	10	g
リン酸１アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
精製水	200	ml
グルコース	20	g
精製水	100	ml
寒天 (Agar No.1)	15	g
精製水	700	ml

ロット番号及び製造日等は、添付書類によると以下のとおりである。

(1) 培地のロット番号： ＡＮ４１０ＩＪ
(2) 培地の製造日： 平成６年９月８日
(3) 寒天の製造元： ＯＸＯＩＤ社、英国
(4) 寒天のロット番号： ７７０８３

b. トップアガー

寒天（Bacto-agar：DIFCO 社、米国；Lot No. 12528 ） 0.6%を含む 0.5%塩化ナトリウム水溶液をオートクレーブ滅菌した後、室温で保存した。使用時に加温溶解し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、あらかじめメンブレンフィルター（φ 0.22 μm：岩城硝子株式会社、東京都千代田区）を用いて濾過除菌しておいた0.5 mM L－ヒスチジン（関東化学株式会社、東京都中央区；Lot No. 210N1018）－0.5 mM D－ビオチン（関東化学株式会社、Lot No. 603E1730）水溶液を 1／10容量加え、45℃に保温した。一方、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mM L－トリプトファン（関東化学株式会社、Lot No. 904R6524）水溶液を 1／10容量加え、同様に45℃に保温した。

3）試験菌株の前培養

試験菌株の前培養には 2.5%ニュートリエントブロス（OXOID 社：No. 2 ；Lot No. 232 51183 ）水溶液を使用した。内容量 200 mℓ の円筒容器に本培養液を 25 mℓ分注し、これに凍結保存した菌懸濁液を融解した後、マイクロピペットを用いて 50 μℓ接種した。培養開始までの間４℃に保存し、その後ウォーターバスシェーカー（ MM-10：タイテック株式会社、埼玉県越谷市）を用い、37℃で８時間振盪（往復振盪： 120回／分）培養した。培養終了後に光電分光光度計（UV50-201：株式会社日立製作所、東京都千代田区）を用いて計測した生菌数を以下に示した。

試　験	生菌数 （×10⁹ /mℓ ）				
	TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
本試験（１回目）	4.74	5.61	5.36	4.75	2.10
本試験（２回目）	4.36	5.11	5.53	4.34	2.03

菌懸濁液については使用時まで室温で保存した。

4) S9 mix

キッコーマン株式会社（千葉県野田市）からS9 mix（Lot No. FSM-317）を購入し、使用時まで超低温フリーザー（−80℃）に保存した。製造後6カ月以内のS9 mixを使用した。

S9のロット番号、誘導物質及び誘導方法等は、添付書類によると以下のとおりである。

a. ロット番号	RAA−317
b. 調製日	平成 6年10月27日
c. 使用動物	ラット：Sprague-Dawley系
d. 性／週齢	雄／7週齢
e. 体重	188 ～ 212 g
f. 誘導物質	Phenobarbital (PB) & 5,6-Benzoflavone (BF)
g. 投与量及び回数	PB：30 mg/kg 1回（1日目）、60 mg/kg 3回（2～4日目） BF：80 mg/kg 1回（3日目）
h. 投与方法	腹腔内投与
i. 蛋白含量	26.9 mg/mℓ

また、S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mℓ 中の量
S9	0.1 mℓ
$MgCl_2$	8 μmol
KCl	33 μmol
G−6−P	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
Na−リン酸緩衝液（pH 7.4）	100 μmol
精製水	残量

5) 被験物質溶液の調製

DMSO（Lot No. 309 K18572778）に被験物質を溶解させ調製原液とした。調製原液を所定濃度に希釈した後、ただちに処理を行った。本被験物質の純度は90.8%であるため、純度換算後の試験用量を標記した。

6）試験用量

あらかじめ１枚のプレートを用いて実施した予備的な試験の結果を以下に示す。

試験用量	S 9	復帰突然変異コロニー数				
(μg/プレート)	mix	TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
0	−	90	8	17	28	6
7.26	−	81	8	13	18	3
36.3	−	69*	6*	12*	21*	3*
182	−	63*	4*	9*	5*	1*
908	−	0*	0*	3*	0*	0*
4540	−	0*	0*	0*	0*	0*
0	+	105	18	26	38	14
7.26	+	85	8	25	36	10
36.3	+	102*	12*	21	15	11*
182	+	63*	6*	15*	15*	5*
908	+	54*	0*	0*	0*	0*
4540	+	0*	0*	0*	0*	0*

＊：試験菌株に対する生育阻害作用が観察された。

本結果を基に、直接法の各菌株に代謝活性化法の TA100、TA1535及び TA1537 でそれぞれ 1.42～45.4 μg/プレート、代謝活性化法の WP2 *uvrA* 及び TA98 で5.68～182 μg／プレートの６用量（公比２）を設定した。

7）対照試験

a. 溶媒対照

溶媒対照として、使用溶媒のDMSO（Lot No. 309 K18572778 ）を用いた。

b. 陽性対照

DMSO（Lot No. 217 K15102078 ）を用いて陽性対照物質を溶解し、調製後は少量ずつに分注して凍結保存（－20℃）した。各菌株について、下記に示した用量で試験した。なお、試験用量の設定は、労働省安全衛生部化学物質調査課編「安衛法における変異原性試験－テストガイドラインとＧＬＰ」に準じた。

《直接法》	菌　株	物質名	試験用量
ネズミチフス菌	TA100	AF-2	0.01 μg／プレート
ネズミチフス菌	TA98	AF-2	0.1 〃
ネズミチフス菌	TA1535	NaN_3	0.5 〃
ネズミチフス菌	TA1537	ACR	80.0 〃
大　腸　菌	WP2 *uvrA*	AF-2	0.01 〃

《代謝活性化法》	菌　株	物質名	試験用量
ネズミチフス菌	TA100	2-AA	1.0 μg／プレート
ネズミチフス菌	TA98	2-AA	0.5 〃
ネズミチフス菌	TA1535	2-AA	2.0 〃
ネズミチフス菌	TA1537	2-AA	2.0 〃
大　腸　菌	WP2 *uvrA*	2-AA	10.0 〃

AF-2：2-(2- フリル) -3-(5-ニトロ -2-フリル) アクリルアミド（和光純薬工業株式会社、大阪府大阪市；純度98.0～102.0 %、Lot No. SAJ0748 ）

NaN_3：アジ化ナトリウム（和光純薬工業株式会社；純度99.0%以上、Lot No. APH4078 ）

ACR ：9-アミノアクリジン（ALDRICH 社、米国；純度98.0%、Lot No. CP01604TM ）

2-AA：2-アミノアントラセン（和光純薬工業株式会社；純度90.0%以上、Lot No. DCL3789 ）

c. 無菌試験

被験物質溶液（調製原液）及びＳ９ mixについて無菌試験を実施した。すなわち、0.1Mナトリウム・リン酸緩衝液 500 μl に調製原液 100 μl を加えたもの、あるいは 500 μl のＳ９ mixに、予め45℃で保温しておいたトップアガー溶液 2 ml を加え、プレート上に注いだ後、軽く回転しながら一様に広げた。37℃、48時間の培養後、雑菌汚染の有無を確認した。本無菌試験は試験毎に実施し、調製原液及びＳ９ mixのいずれについても１枚のプレートを用いた。

8）被験物質あるいは対照物質の処理及び培養時間

滅菌済み小試験管に、使用溶媒、被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液を 100 μl 、次いで 0.1M ナトリウム・リン酸緩衝液（pH 7.4）を 500 μl （直接法の場合）、あるいはＳ９ mixを 500 μl （代謝活性化法の場合）を入れた。さらに前培養した試験菌株の懸濁液 100 μl を加え、ウォーターバスシェーカーを用い37℃で20分間振盪培養（プレインキュベーション）した。トップアガー 2 ml を加え、注意しながら混合した後、内容物をプレート上に注ぎ一様に広げた。重層した軟寒天が固化した後、プレートを上下転倒し恒温器を用いて、37℃の条件で48時間培養を続けた。

独立して試験を２回繰り返して実施した。

9）プレート数及び識別

用量当たりそれぞれ３枚のプレートを使用した。

油性ペンで番号等を明記することにより、各プレートを識別した。

10）コロニー数の測定

被験物質の抗菌作用を確認するため、実体顕微鏡（×60）を用いてプレート上の試験菌株の生育阻害について調べた。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際しては自動コロニーアナライザー（ CA-11；システムサイエンス株式会社、東京都福生市）を用い、面積補正ならびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した。

11）結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ２倍以上に増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に、陽性と判定した。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

１１．試　験　結　果：

1,2,3-トリメチルベンゼン調製溶液ならびにＳ９ mixの無菌試験において、菌の増殖（雑菌汚染）は認められなかった。

1）本試験（１回目）

各用量における復帰突然変異コロニー数を Figure 1 ～ 5 及び Table 1～2 に示した。

1,2,3-トリメチルベンゼン処理による試験菌株に対する生育阻害作用が、直接法及び代謝活性化法の全ての試験菌株の最高用量において観察された。

復帰突然変異コロニー数については、直接法、代謝活性化法とも溶媒対照と同等の値であり、明確な増加傾向は認められなかった。

陽性対照物質はそれぞれの菌株において、溶媒対照群の２倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。

Ｓ９ mix添加時、182 μg／プレートの用量において僅かな白濁が見られたが、コロニー計数時には特筆すべき変化は観察されなかった。

2）本試験（２回目）

各用量における復帰突然変異コロニー数を Figure 1 ～ 5 及び Table 3～4 に示した。

1,2,3-トリメチルベンゼン処理による生育阻害作用が、各試験系、各試験菌株の高用量群において認められた。

復帰突然変異により生じたコロニー数は直接法及び代謝活性化法のいずれの試験菌株においても溶媒対照値の２倍を越えることはなかった。

陽性対照物質は各検定菌株に対し、復帰突然変異を顕著に誘発した。

Ｓ９ mix添加時、182 μg／プレートの用量において僅かな白濁が見られたが、コロニー計数時には特筆すべき変化は観察されなかった。

以上２回の試験において、直接法及び代謝活性化法の両試験とも再現性が確認された。

１２．考察及び結論：

1,2,3-トリメチルベンゼンの変異原性、すなわち遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、微生物（ネズミチフス菌・大腸菌）を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。
最高用量として各試験菌株の増殖を抑制する用量まで検討した。その結果、1,2,3-トリメチルベンゼン処理群では直接法及び代謝活性化法のいずれにおいても、復帰突然変異コロニー数が溶媒対照と同等の値を示し、増加傾向は認められなかった。
一方、陽性対照群あるいは溶媒対照群でのコロニー数はいずれも当施設での背景データの範囲内であり、本試験が有効であることを示していた。

以上の試験結果から、本試験条件下において1,2,3-トリメチルベンゼンの微生物に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

１３．参考とした資料：

- Ames, B. N., Lee, F.D. and Durston, W.E. : An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 782 ～ 786, 1973.

- Ames, B. N. *et al*, : Carcinogens are mutagens : A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 2,281 ～ 2,285, 1973.

- Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, Mut. Res., 31, 347 ～ 364, 1975.

- 環境中の発ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について、蛋白質・核酸・酵素、20（13）、16～27, 1975.

- 労働省安全衛生部化学物質調査課編： 安衛法における変異原性試験－テストガイドラインとＧＬＰ－、中央労働災害防止協会、1991.

Exp. No. 2465 (115-032)

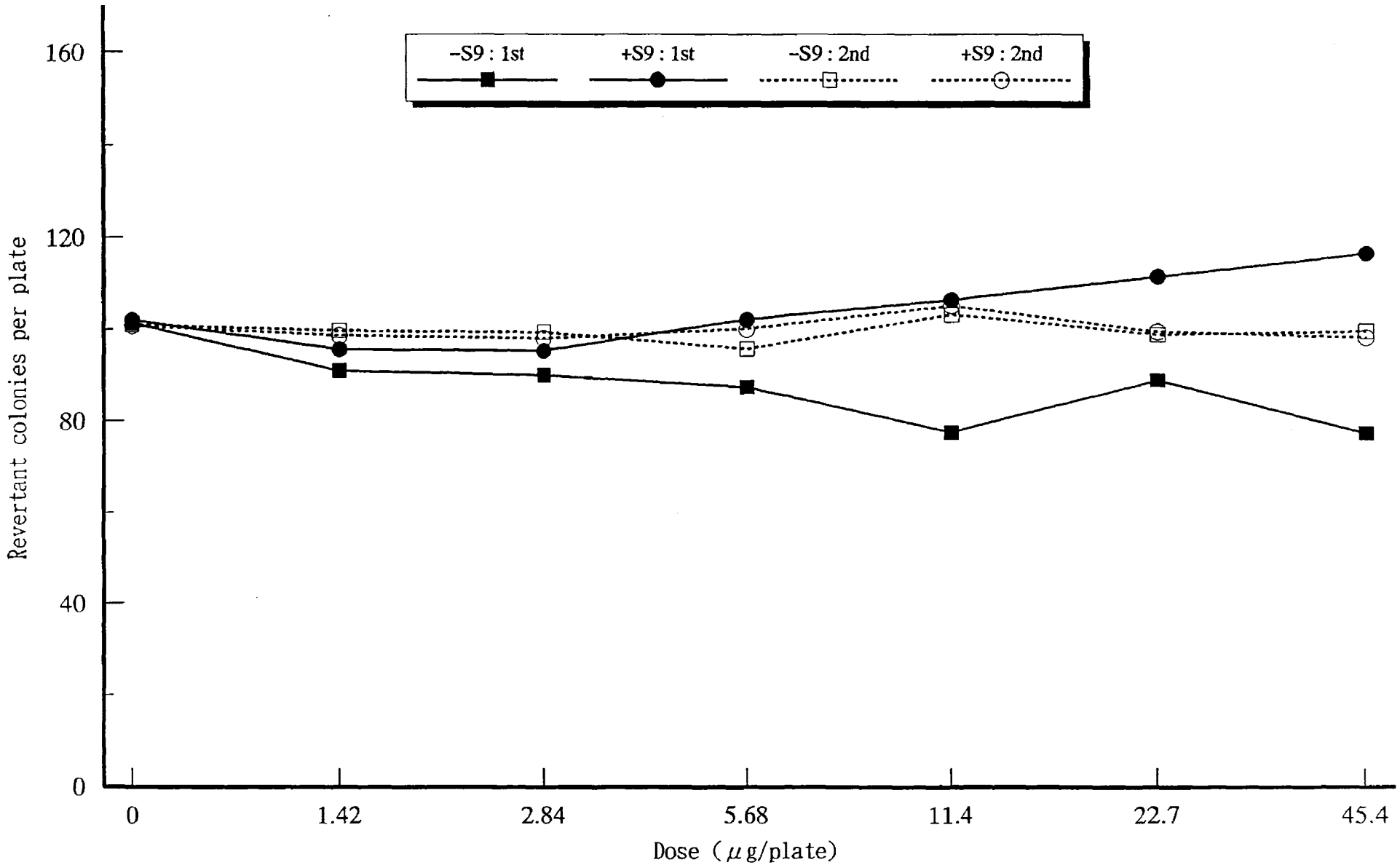


Figure 1. Bacterial reversion test of 1, 2, 3-Trimethylbenzene in strain TA100

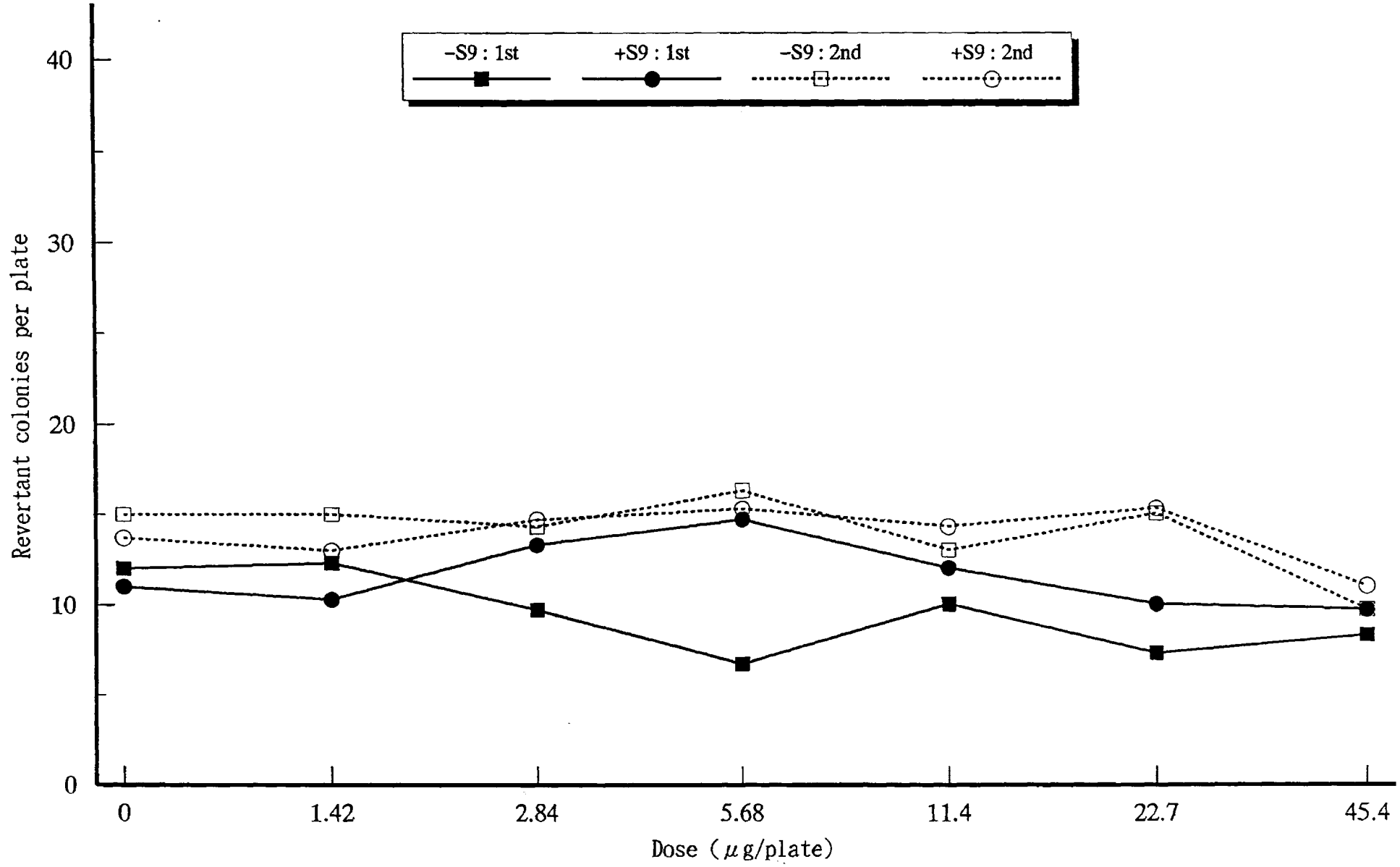


Figure 2. Bacterial reversion test of 1, 2, 3–Trimethylbenzene in strain TA1535

Exp. No. 2465 (115-032)

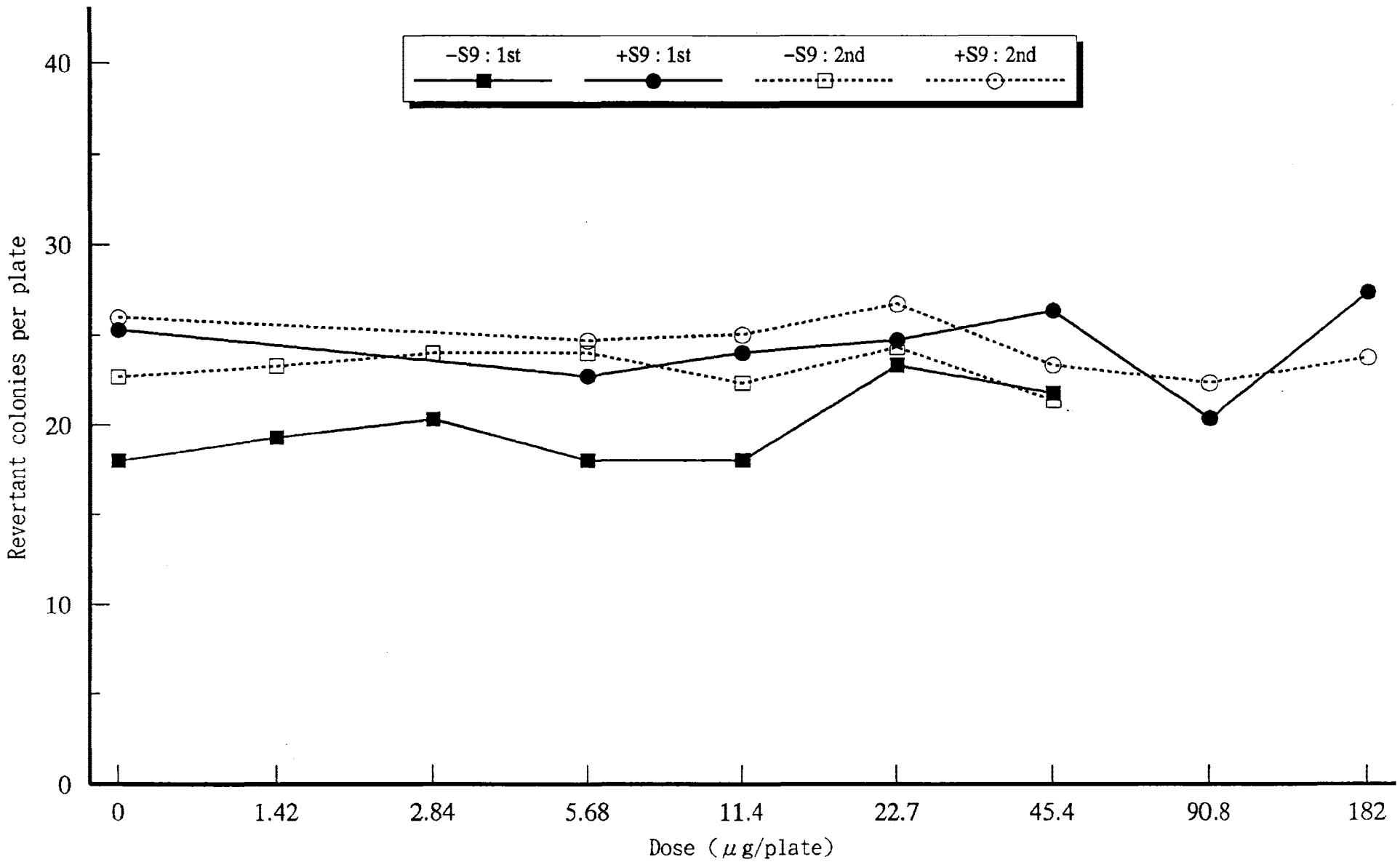


Figure 3. Bacterial reversion test of 1, 2, 3-Trimethylbenzene in strain WP2*uvrA*

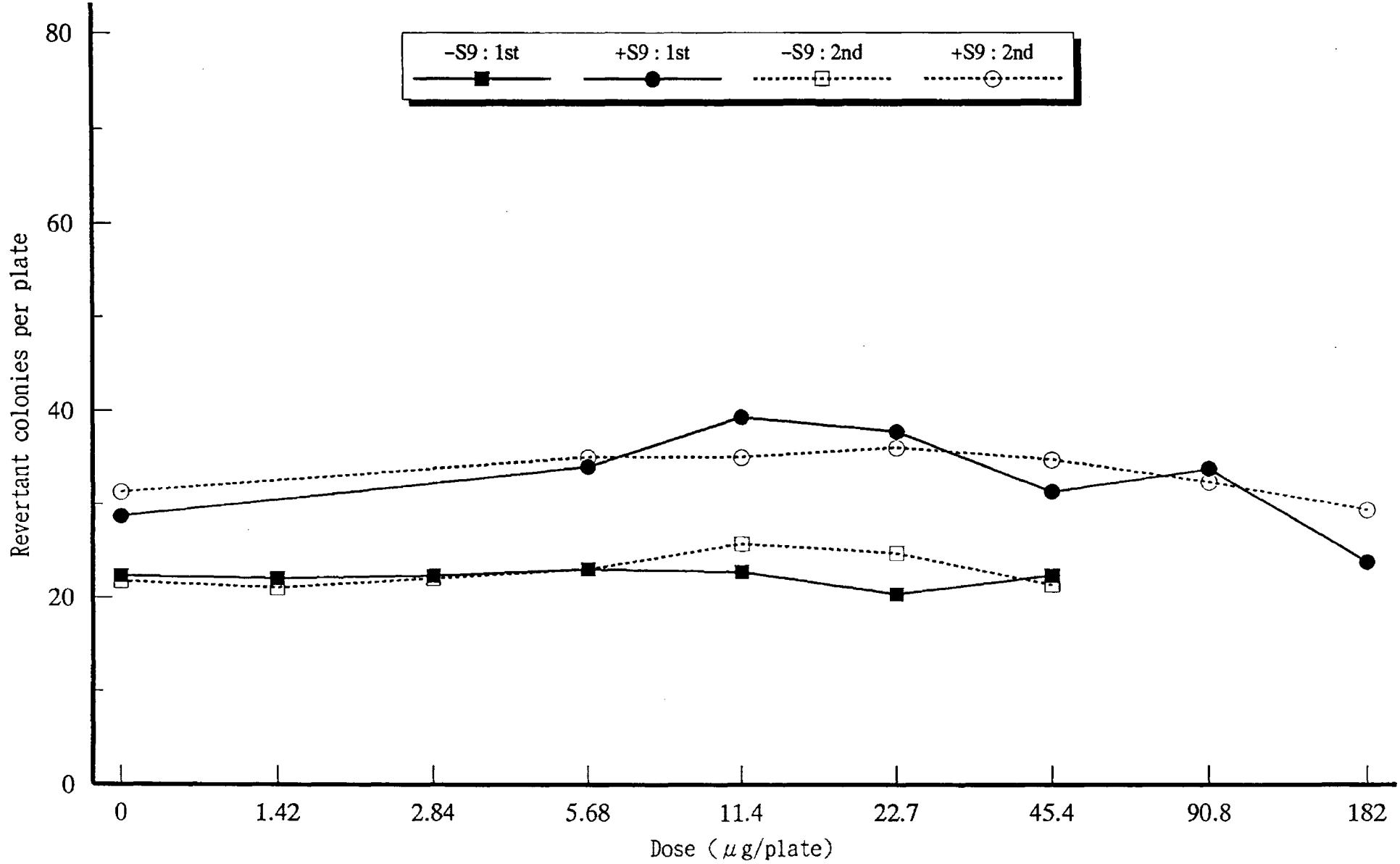


Figure 4. Bacterial reversion test of 1, 2, 3-Trimethylbenzene in strain TA98

Exp. No. 2465 (115-032)

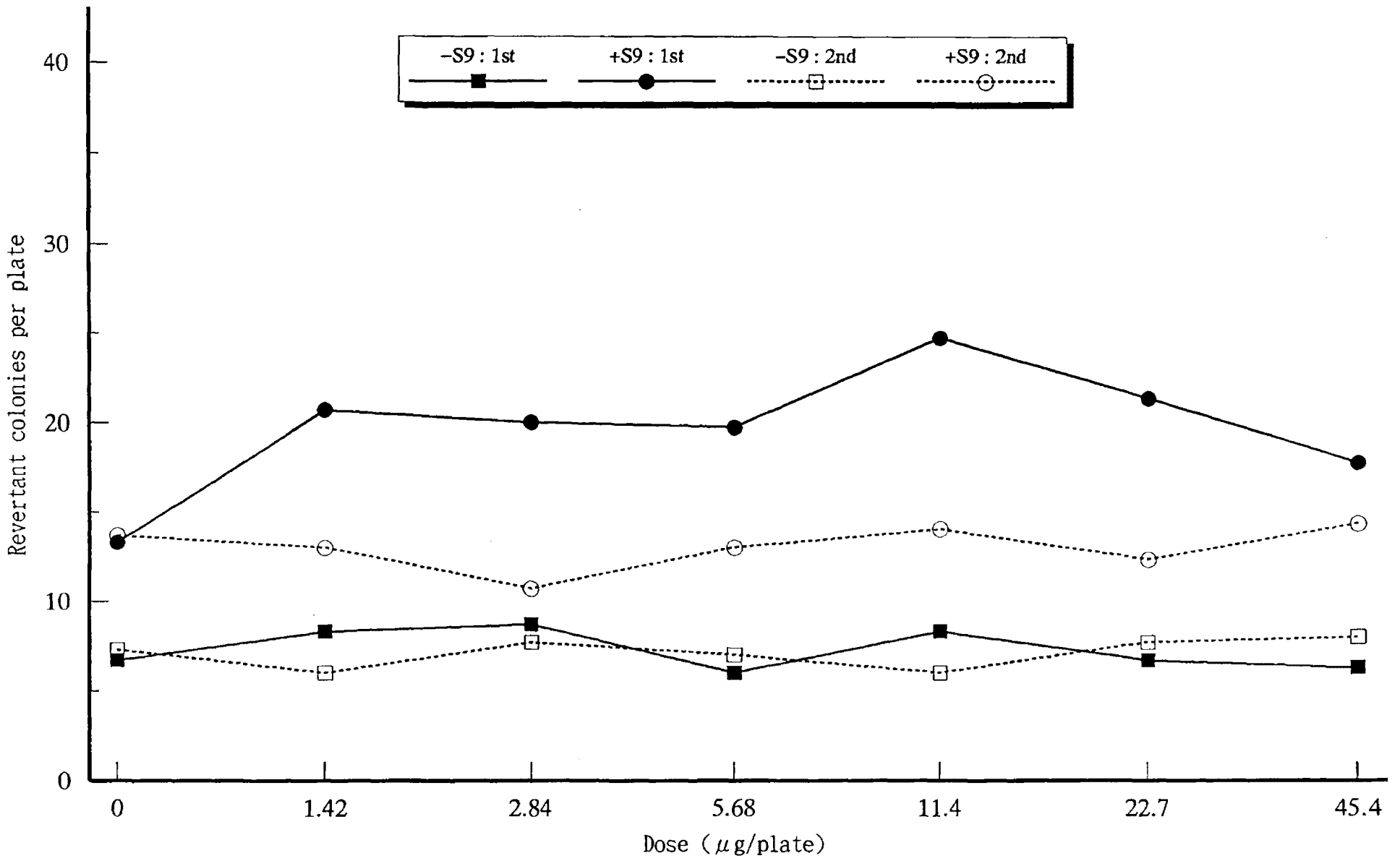


Figure 5. Bacterial reversion test of 1, 2, 3-Trimethylbenzene in strain TA1537

Table 1. Results of the bacterial reversion test of 1,2,3-Trimethylbenzene (1st trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose	Revertant colonies per plate [Mean±S.D.]				
	(μg/plate)	TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
DMSO#	0	97 104 103 [101 ± 4]	10 12 14 [12 ± 2]	15 21 18 [18 ± 3]	18 24 25 [22 ± 4]	4 6 10 [7 ± 3]
Test sub.	1.42	87 101 85 [91 ± 9]	7 14 16 [12 ± 5]	22 23 13 [19 ± 6]	18 19 29 [22 ± 6]	8 9 8 [8 ± 1]
	2.84	97 91 82 [90 ± 8]	12 8 9 [10 ± 2]	18 19 24 [20 ± 3]	22 19 26 [22 ± 4]	7 9 10 [9 ± 2]
	5.68	74 94 94 [87 ± 12]	4 11 5 [7 ± 4]	13 19 22 [18 ± 5]	20 22 27 [23 ± 4]	5 9 4 [6 ± 3]
	11.4	80 83 69 [77 ± 7]	5 13 12 [10 ± 4]	17 21 16 [18 ± 3]	25 21 22 [23 ± 2]	7 10 8 [8 ± 2]
	22.7	83 88 95 [89 ± 6]	7 8 7 [7 ± 1]	31 18 21 [23 ± 7]	26 20 15 [20 ± 6]	6 7 7 [7 ± 1]
	45.4	77* 66* 88* [77 ± 11]	8* 6* 11* [8 ± 3]	25* 14* 26* [22 ± 7]	19* 26* 22* [22 ± 4]	5* 9* 5* [6 ± 2]
Positive control		558 579 517[a)] [551 ± 32]	402 345 345[b)] [364 ± 33]	107 140 106[a)] [118 ± 19]	528 588 565[c)] [560 ± 30]	620 580 585[d)] [595 ± 22]

: Solvent control * : Cell death was observed
a) : AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01μg/plate b) : NaN_3; Sodium azide, 0.5μg/plate
c) : AF-2, 0.1μg/plate d) : ACR; 9-Aminoacridine, 80μg/plate

Table 2. Results of the bacterial reversion test of 1,2,3-Trimethylbenzene (1st trial)
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean±S.D.] TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
DMSO#	0	109 100 97 [102 ± 6]	8 11 14 [11 ± 3]	26 23 27 [25 ± 2]	28 25 33 [29 ± 4]	14 11 15 [13 ± 2]
Test sub.	1.42	97 94 96 [96 ± 2]	9 7 15 [10 ± 4]	–	–	23 23 16 [21 ± 4]
	2.84	94 102 90 [95 ± 6]	13 15 12 [13 ± 2]	–	–	17 20 23 [20 ± 3]
	5.68	89 110 107 [102 ± 11]	13 20 11 [15 ± 5]	21 26 21 [23 ± 3]	32 30 40 [34 ± 5]	20 17 22 [20 ± 3]
	11.4	114 99 106 [106 ± 8]	18 9 9 [12 ± 5]	29 26 17 [24 ± 6]	40 37 41 [39 ± 2]	24 23 27 [25 ± 2]
	22.7	108 121 105 [111 ± 9]	6 10 14 [10 ± 4]	24 26 24 [25 ± 1]	33 37 43 [38 ± 5]	25 17 22 [21 ± 4]
	45.4	110* 121* 118* [116 ± 6]	8* 10* 11* [10 ± 2]	25 24 30 [26 ± 3]	33 37 24 [31 ± 7]	14* 24* 15* [18 ± 6]
	90.8	–	–	14 25 22 [20 ± 6]	38 33 30 [34 ± 4]	–
	182	–	–	28* 28* 26* [27 ± 1]	26* 21* 24* [24 ± 3]	–
Positive control		620 580 583[a] [594 ± 22]	272 367 321[b] [320 ± 48]	577 554 646[c] [592 ± 48]	314 287 288[d] [296 ± 15]	130 120 97[b] [116 ± 17]

: Solvent control * : Cell death was observed – : Not tested
a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1μg/plate b) : 2-AA, 2μg/plate c) : 2-AA, 10μg/plate d) : 2-AA, 0.5μg/plate

Table 3. Results of the bacterial reversion test of 1,2,3-Trimethylbenzene (2nd trial)
[direct method : -S9]

Compound	Dose	Revertant colonies per plate [Mean±S.D.]				
	(μg/plate)	TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
DMSO#	0	94 103 106 [101 ± 6]	16 15 14 [15 ± 1]	20 21 27 [23 ± 4]	21 20 24 [22 ± 2]	7 8 7 [7 ± 1]
Test sub.	1.42	101 98 100 [100 ± 2]	14 16 15 [15 ± 1]	27 21 22 [23 ± 3]	21 20 22 [21 ± 1]	5 5 8 [6 ± 2]
	2.84	94 105 99 [99 ± 6]	16 14 13 [14 ± 2]	23 24 25 [24 ± 1]	24 20 22 [22 ± 2]	8 8 7 [8 ± 1]
	5.68	97 98 92 [96 ± 3]	15 17 17 [16 ± 1]	22 25 25 [24 ± 2]	22 23 24 [23 ± 1]	8 6 7 [7 ± 1]
	11.4	102 103 104 [103 ± 1]	16 11 12 [13 ± 3]	26 21 20 [22 ± 3]	26 26 25 [26 ± 1]	6 8 4 [6 ± 2]
	22.7	103 93 100 [99 ± 5]	15 15 15 [15 ± 0]	24 26 23 [24 ± 2]	27 23 24 [25 ± 2]	7 6 10 [8 ± 2]
	45.4	107* 94* 97* [99 ± 7]	10* 10* 9* [10 ± 1]	22* 22* 20* [21 ± 1]	23* 20* 21* [21 ± 2]	9* 6* 9* [8 ± 2]
Positive control		428 394 437[a)] [420 ± 23]	375 442 502[b)] [440 ± 64]	109 107 110[a)] [109 ± 2]	631 645 659[c)] [645 ± 14]	586 597 450[d)] [544 ± 82]

: Solvent control * : Cell death was observed
a) : AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01μg/plate b) : NaN_3; Sodium azide, 0.5μg/plate
c) : AF-2, 0.1μg/plate d) : ACR; 9-Aminoacridine, 80μg/plate

Table 4. Results of the bacterial reversion test of 1,2,3-Trimethylbenzene (2nd trial)
[activation method : +S9]

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean±S.D.] TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
DMSO#	0	101 99 102 [101 ± 2]	10 16 15 [14 ± 3]	27 23 28 [26 ± 3]	28 32 34 [31 ± 3]	14 14 13 [14 ± 1]
Test sub.	1.42	96 109 91 [99 ± 9]	13 16 10 [13 ± 3]	–	–	14 13 12 [13 ± 1]
	2.84	98 94 102 [98 ± 4]	12 18 14 [15 ± 3]	–	–	9 9 14 [11 ± 3]
	5.68	99 96 105 [100 ± 5]	13 17 16 [15 ± 2]	26 21 27 [25 ± 3]	35 36 34 [35 ± 1]	14 10 15 [13 ± 3]
	11.4	102 107 106 [105 ± 3]	15 15 13 [14 ± 1]	27 27 21 [25 ± 3]	34 39 32 [35 ± 4]	14 14 14 [14 ± 0]
	22.7	90 105 103 [99 ± 8]	15 18 13 [15 ± 3]	27 26 27 [27 ± 1]	33 37 38 [36 ± 3]	10 13 14 [12 ± 2]
	45.4	106* 98* 90* [98 ± 8]	9* 12* 12* [11 ± 2]	24 25 21 [23 ± 2]	34 31 39 [35 ± 4]	15* 15* 13* [14 ± 1]
	90.8	–	–	21* 23* 23* [22 ± 1]	35* 30* 32* [32 ± 3]	–
	182	–	–	24* 20* 27* [24 ± 4]	33* 30* 25* [29 ± 4]	–
Positive control		658 716 764[a] [713 ± 53]	299 321 294[b] [305 ± 14]	528 504 607[c] [546 ± 54]	406 324 322[d] [351 ± 48]	104 105 111[b] [107 ± 4]

: Solvent control * : Cell death was observed – : Not tested
a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1μg/plate b) : 2-AA, 2μg/plate c) : 2-AA, 10μg/plate d) : 2-AA, 0.5μg/plate